

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. März 2004 (25.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/025299 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/533

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009299

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. August 2003 (21.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 39 098.3 26. August 2002 (26.08.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
DE, US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH];
Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel (CH).

(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GIESEN, Ursula
[DE/DE]; Am Eselsberg 9, 82362 Weilheim (DE).
HEINZE, Jürgen [DE/DE]; Albertstr. 21, 79104 Freiburg
(DE). BORGWARTH, Kai [DE/DE]; Reiterstr. 6, 79100
Freiburg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, Franz, Albert usw.; Weick-
mann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,

KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENERATION OF CHEMILUMINESCENCE BY HYDROGEN

(54) Bezeichnung: ERZEUGUNG VON CHEMILUMINESZENZ DURCH WASSERSTOFF

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying an analyte in a sample while using a luminescent metal complex as a marker group, and to a device suited for carrying out this method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes als Markierungsgruppe und eine dafür geeignete Vorrichtung.

WO 2004/025299 A1

Erzeugung von Chemilumineszenz durch Wasserstoff

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von Chemilumineszenz umfassend die Bereitstellung einer chemilumineszierenden Spezies durch naszierenden Wasserstoff. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines
10 Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes als Markierungsgruppe und eine dafür geeignete Vorrichtung.

Lumineszierende Metallkomplexe sind aus dem Stand der Technik bekannt.
15 EP-A-O 178 450 offenbart Rutheniumkomplexe, die an ein immunologisch aktives Material gekoppelt sind, wobei die Rutheniumkomplexe drei gleiche oder verschiedene bi- oder polycyclische Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen enthalten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe, wie SO_3H
20 oder $-\text{COOH}$, substituiert ist und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe wie $-\text{COOH}$ direkt oder über eine Spacergruppe substituiert ist und wobei die Liganden über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

25 Weiterhin ist die Verwendung von lumineszierenden Metallkomplexen als Markierungsreagenzien für ein Elektrochemilumineszenz-Nachweisverfahren bekannt (vgl. z.B. EP-A-O 580 979, WO 87/06706, US 5,238,108 oder US 5,310,687). Ein solches Elektrochemilumineszenz-Nachweisverfahren beruht darauf, dass in einer geeigneten Messvorrichtung das Zentralatom
30 des Metallkomplexes, z.B. Ruthenium, durch Elektronentransfer in den angeregten MLCT-Triplettzustand überführt wird. Von diesem angeregten Zustand kann es unter Emission eines Photons durch einen verbotenen

Triplett-Singulett-Übergang in den Grundzustand relaxieren (vgl. z.B. WO/90 05296, Leland und Powell, J. Electrochem. Soc. 137 (1990), 3127-3131; Blackburn et al., Clin. Chem. 37 (1991), 1534-1539).

5 Der in der Literatur beschriebene Reaktionsmechanismus für die Erzeugung von Chemilumineszenz umfasst die Oxidation eines Mediators, wie Tripropylamin, zu einem Radikalkation. Dieses Radikalkation wird unter Protonenverlust zu einem TPA-Radikal. Das TPA-Radikal ist wiederum
10 dasjenige Molekül, welches durch einen weiteren Elektronenübergang einen oxidierten Metallkomplex, z.B. einen Ru^{3+} -Komplex, in den Ru^{2+} -MLCT-Triplettzustand überführt, welcher in der Lage ist, ein Photon zu emittieren.

Mit dem geschilderten Mechanismus lassen sich jedoch einige experimentelle Befunde nicht erklären. So werden nur 40-50 % des
15 theoretischen Stromes gefunden. Weiterhin ist die Erzeugung von Elektrochemilumineszenz in hohem Maße vom Elektrodenmaterial abhängig, was anhand der Funktion der Elektrode als Oxidationsmittel von TPA und dem Metallkomplex eigentlich nicht der Fall sein dürfte. Weiterhin wurden bisher auch keine TPA-Dimere nachgewiesen, die - falls TPA-Radikale
20 gemäß obigem Mechanismus entstehen - in Lösung gebildet werden sollten.

Es wurden daher weitere Untersuchungen zur Erzeugung von Chemilumineszenz bei Metallkomplexen durchgeführt. Dabei wurde
25 überraschenderweise gefunden, dass ein Rutheniumkomplex in Gegenwart von naszierendem Wasserstoff, z.B. erzeugt durch Lithium/Butanol/ H_2SO_4 , Chemilumineszenz in hoher Ausbeute zeigt.

Auf Basis dieser neuen Erkenntnisse kann ein neues Verfahren zur
30 Erzeugung von Chemilumineszenz mit einem Metallkomplex als Lumineszenzgenerator bereitgestellt werden, welches die Verwendung von naszierendem Wasserstoff zur Reduktion von oxidierten Metallkomplexen

in den angeregten chemilumineszenzfähigen Zustand umfasst. Dieses Verfahren kann insbesondere zum Nachweis von Analyten in einer Probe eingesetzt werden, wobei gegenüber bisher verwendeten Verfahren eine verbesserte Chemilumineszenzausbeute oder/und eine verringerte
5 Störanfälligkeit erzielt werden kann.

Ein erster Aspekt der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Erzeugung von Chemilumineszenz mit einem lumineszierenden Metallkomplex als Lumineszenzgenerator, umfassend das Oxidieren des Metallkomplexes und
10 das Reduzieren des Metallkomplexes durch naszierenden Wasserstoff, wobei eine chemilumineszenzfähige Form des Metallkomplexes entsteht.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden
15 Metallkomplexes als Markierungsgruppe, wobei die Lumineszenz des Metallkomplexes erzeugt wird durch die Schritte:

- (i) Oxidieren des Metallkomplexes und
- (ii) Reduzieren des Metallkomplexes durch naszierenden Wasserstoff,
20 wobei eine chemilumineszenzfähige Form des Metallkomplexes entsteht, und
- (iii) Bestimmen des Analyten über die Chemilumineszenz.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Erzeugung von Chemilumineszenz unter Verwendung eines lumineszierenden
25 Metallkomplexes als Lumineszenzgenerator, umfassend:

- (i) Mittel zum Oxidieren des Metallkomplexes und
- (ii) Mittel zum Erzeugen von naszierendem Wasserstoff.

Insbesondere ist diese Vorrichtung vorgesehen zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes als Markierungsgruppe, umfassend:

- 5 (i) Mittel zum Oxidieren des Metallkomplexes,
- (ii) Mittel zum Erzeugen von naszierendem Wasserstoff und
- (iii) Mittel zum Nachweis von Lumineszenz.

10 Besonders bevorzugt dient das Verfahren für Anwendungen auf dem Gebiet der Diagnostik, d.h. zum Nachweis eines Analyten in einer Probe. Beispielsweise kann das Verfahren zum Nachweis von physikalischen, chemischen oder biochemischen Parametern in einer Probe, z.B. einer Körperflüssigkeit, einer Gewebeprobe etc. oder einer Umweltprobe, eingesetzt werden.

15 Der Nachweis eines Analyten umfasst das Inkontaktbringen einer Probe mit einem Nachweisreagenz, das als Markierungsgruppe einen lumineszierenden Metallkomplex trägt. Die Probe ist vorzugsweise eine biologische Probe und liegt in flüssiger Form vor. Sie kann aus
20 menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Geweben, Körperflüssigkeiten, prokaryontischen oder eukaryontischen Zellkulturen etc. stammen.

Das Nachweisreagenz umfasst einen lumineszierenden Metallkomplex als Markierungsgruppe, der vorzugsweise an eine biologische Substanz, z.B.
25 Biotin, Nukleinsäuren, z. B. Oligonukleotide, DNA oder RNA, Nukleinsäureanaloga, wie etwa peptidische Nukleinsäuren, Antikörper oder Antikörperfragmente, Peptid- oder Polypeptidantigene, d.h. immunologisch reaktive Polypeptide oder Haptene, d.h. organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von 150 bis 2000, gekoppelt ist, sowie gegebenenfalls
30 weitere Reagenzien, wie sie dem Fachmann bekannt sind.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens umfasst vorzugsweise eine Inkubation der Probe mit dem Nachweisreagenz, um eine direkte oder indirekte Reaktion des Nachweisreagenz mit in der Probe vorhandenem Analyten zu bewirken. Das Vorhandensein eines Analyten
5 bzw. dessen Menge in der Probe wird auf Basis des von der Markierungsgruppe stammenden Chemilumineszenzsignals qualitativ oder/und quantitativ ermittelt.

Das Verfahren kann als homogener Assay, d.h. Messung der
10 Chemilumineszenz in einer Flüssigphase, durchgeführt werden. Vorzugsweise wird jedoch ein heterogener Test durchgeführt, bei dem die Chemilumineszenz-Markierung an einer Festphase, z.B. einer partikulären Festphase, wie etwa magnetischen Mikrobeads, z.B. Streptavidin-
15 beschichteten Mikrobeads, oder kolloidalen Partikeln immobilisiert wird. Bei Durchführung eines heterogenen Tests kann das erfindungsgemäße Verfahren sogenannte Einfang- und Waschschrte umfassen, bei denen die Markierung auf der Festphase immobilisiert wird und eine Abtrennung der übrigen Probenbestandteile erfolgt.

20 Ein bevorzugte Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Verwendung von chemilumineszenten Metallkomplexen, die eine Struktur der allgemeinen Formel (I) enthalten:



25

worin M ein zwei- oder dreiwertiges Metallkation ausgewählt aus Seltenerde- oder Übergangsmetallkationen ist,

L₁, L₂ und L₃ gleich oder verschieden sind und Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei L₁, L₂ und L₃ über
30 Stickstoffatome an das Metallkation gebunden sind,

Y einen an einen der Liganden gebundenen Linker bedeutet, über den der Komplex, z.B. (a) an eine biologische Substanz gekoppelt ist oder (b) an eine biologische Substanz gekoppelt werden kann,

5 m eine ganze Zahl von 1 bis 10, vorzugsweise von 1 bis 4 und besonders bevorzugt von 1 ist und
n eine ganze Zahl von 1 bis 6, vorzugsweise 1 bis 3 und besonders bevorzugt von 1 ist.

Das Metallkation in diesem Komplex ist vorzugsweise Ruthenium, Osmium,
10 Rhenium, Iridium, Rhodium, Platin, Indium, Palladium, Molybdän, Technetium, Kupfer, Chrom, Wolfram, Yttrium oder Lutetium. Besonders bevorzugt sind Ruthenium, Iridium, Rhenium, Chrom und Osmium. Am meisten bevorzugt ist Ruthenium. Zum Ladungsausgleich kann der Komplex gegebenenfalls noch Gegenionen, z.B. Anionen, enthalten.

15 Die Liganden L_1 , L_2 und L_3 sind vorzugsweise Liganden mit mindestens 2 stickstoffhaltigen Heterocyclen. Bevorzugt sind aromatische Heterocyclen, wie z.B. Bipyridyl, Bipyrazyl, Terpyridyl und Phenanthronyl. Besonders bevorzugt werden die Liganden aus Bipyridin- und Phenanthrolin-
20 Ringsystemen ausgewählt.

In den erfindungsgemäßen Metallkomplexen sind vorzugsweise hydrophile Gruppen oder/und Ladungsträger vorhanden, die beispielsweise kovalent gebunden, z.B. an den Linker oder an einen anderen Substituenten der
25 Liganden L_1 , L_2 oder L_3 , sind. Derartige hydrophile oder geladene Metallkomplexe sind z.B. aus WO 96/03409 und WO 96/03410 bekannt. Der Begriff "Ladungsträger" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Gruppe, die bei einem pH-Wert in einem Bereich von 6 bis 8 überwiegend in ionischer Form vorliegt. Der Komplex enthält vorzugsweise
30 bis zu 10, besonders bevorzugt 2 bis 8 solcher Ladungsträger.

Besonders bevorzugt enthält der Komplex mindestens einen negativen Ladungsträger. Beispiele für geeignete negative Ladungsträger sind Phosphat-, Phosphonat-, Sulfonat- und Carboxylatgruppen, wobei Sulfonat- und Carboxylatgruppen am meisten bevorzugt sind.

5

Weiterhin sind für das erfindungsgemäße Verfahren Komplexe geeignet, die eine hydrophile Gruppe enthalten. Beispiele für geeignete hydrophile Gruppen sind C₂-C₃-Alkylenoxy-Einheiten, C₂-C₃-Alkylenthio-Einheiten und Polyhydroxyeinheiten.

10

Die Herstellung solcher Metallkomplexe kann nach bekannten Methoden erfolgen, beispielsweise durch Reaktion eines Metallsalzes, z.B. eines Metallhalogenids, und gegebenenfalls anschließendem Austausch des Halogenidions durch Hexafluorophosphat-, Trifluoracetat- oder Tetrafluoroborat-Gruppen. Derartige Verfahren sind bekannt. Der Metallkomplex wird für das erfindungsgemäße Verfahren üblicherweise in Form von Konjugaten mit einer biologischen Substanz eingesetzt, wobei an die biologische Substanz mindestens ein Metallkomplex gekoppelt ist. Beispiele für geeignete biologische Substanzen sind Zellen, Viren, subzelluläre Teilchen, Proteine, Lipoproteine, Glycoproteine, Peptide, Polypeptide, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Polysaccharide, Lipopolysaccharide, zelluläre Metaboliten, Haptene, Hormone, pharmakologische Wirkstoffe, Alkaloide, Steroide, Vitamine, Aminosäuren und Zucker.

20
25

Die Kopplung des Metallkomplexes mit der biologischen Substanz erfolgt vorzugsweise über eine reaktive oder aktivierbare funktionelle Gruppe am Metallkomplex, z.B. ein Carbonsäurehalogenid, ein Carbonsäureanhydrid oder einen Aktivester, wie etwa ein N-Hydroxy-Succinimidester, oder ein Maleimid, die mit einer funktionellen Gruppe der biologischen Substanz kovalent koppeln kann. Wenn die funktionelle Gruppe ein Carbonsäureanhydrid, Carbonsäurehalogenid oder Aktivester ist, kann

30

beispielsweise eine Kopplung mit freien Aminogruppen der biologischen Substanz erfolgen. Wenn die funktionelle Gruppe ein Maleimidrest ist, kann eine Kopplung mit freien SH-Gruppen der biologischen Substanz erfolgen. Auf analoge Weise kann auch eine Aktivierung von funktionellen Gruppen der biologischen Substanz erfolgen, die anschließend beispielsweise mit einer freien Carbonsäure-, Amino- oder Thiofunktion des Metallkomplexes reagieren können.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die Schritte (i) Oxidieren des Metallkomplexes und (ii) Reduzieren des Metallkomplexes. Die Oxidation des Zentralatoms des Metallkomplexes kann elektrochemisch oder chemisch erfolgen. Für die elektrochemische Oxidation wird ein für das jeweilige Metallion ausreichendes anodisches Potential an eine Elektrode angelegt. Für den Übergang $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ beträgt dieses Potential vorzugsweise mindestens +1,2 V, besonders bevorzugt +1,2 bis +1,4 V (bezogen auf eine Ag/AgCl-Referenzelektrode). Alternativ kann die Oxidation des Zentralatoms des Metallkomplexes auch chemisch erfolgen. Beispiele für geeignete chemische Oxidationsmittel sind PbO_2 , Permanganat, Ce^{4+} -Verbindungen oder/und Peroxodisulfate.

Bei einer vorhergehenden chemischen Oxidation findet die nachfolgende Reduktion vorzugsweise räumlich oder/und zeitlich getrennt statt, beispielsweise in zwei separaten Reaktionskammern, wobei in der ersten Reaktionskammer die Oxidation und in der zweiten Kammer die Reduktion durchgeführt wird. Vor der Reduktion wird vorzugsweise überschüssiges Oxidationsmittel entfernt, z.B. durch Wegführen oder/und - im Falle eines heterogenen Tests mit einer Festphasen-gebundenen Markierungsgruppe - durch Waschen der Festphase. Alternativ kann ein Überschuss des Oxidationsmittels auch von einer dritten Substanz zerstört werden.

Wird eine elektrochemische Oxidation des Metallkomplexes durchgeführt, kann das Verfahren in einer einzigen Kammer durchgeführt werden, in die

während des Reduktionsschrittes naszierender Wasserstoff erzeugt oder/und eingeleitet wird.

Der Reduktionsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Erzeugen von naszierendem Wasserstoff, um den oxidierten Metallkomplex in einen Zustand überzuführen, der die Emission eines Chemilumineszenzphotons erlaubt. Um eine möglichst hohe Effizienz der Reduktion zu erreichen, ist es bevorzugt, dass der naszierende Wasserstoff in unmittelbarer Nachbarschaft des Metallkomplexes, insbesondere in einem Abstand bis maximal 50 nm entsteht. Der naszierende Wasserstoff kann elektrochemisch, chemisch oder/und durch Ultraschall erzeugt werden. Die elektrochemische Erzeugung des naszierenden Wasserstoffs erfolgt vorzugsweise durch Anlegen einer Spannung von $\leq -1,0$ V (bezogen auf eine Ag/AgCl-Referenzelektrode). Die chemische Erzeugung von naszierendem Wasserstoff kann durch bekannte Reagenzien, wie etwa Li/Butanol/H₂SO₄, Zn-Cu/Ethanol oder Zn/HCl, erfolgen. Die Erzeugung des naszierenden Wasserstoffs mittels Ultraschall erfolgt vorzugsweise durch Ablösen bzw. Herausschlagen von Wasserstoff-Radikalen aus organischen Verbindungen, insbesondere Alkylverbindungen. Die Ultraschallenergie liegt hierbei vorzugsweise im Bereich von 0,1-10 MHz, besonders bevorzugt bei ca. 1 MHz (Suslick & Price, Annu. Rev. Mater. Sci 29 (1999), 295; Mizik & Ries, Ann. NY Acad. Sci 899 (2000), 335).

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst zunächst eine chemische Oxidation des Metallkomplexes und anschließend eine elektrochemische Erzeugung von naszierendem Wasserstoff, z.B. in einer elektrochemischen Zelle, welche den naszierenden Wasserstoff in hoher Konzentration zur Verfügung stellt. Beispiele für geeignete elektrochemische Zellen sind in EP-A-O 658 760 beschrieben. Auch bei dieser Ausführungsform ist es zweckmäßig, dass Oxidation und Erzeugung von naszierendem Wasserstoff in zwei getrennten Reaktionskammern erfolgen.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden:

Beispiel Chemilumineszenz durch naszierenden Wasserstoff

5

Ein Ruthenium(bipyridyl)₃-Komplex (mit einem Ru²⁺-Kation) wurde zu einem Ru³⁺-Komplex oxidiert. Hierzu wurde ein homogenes System aus Li/Butanol/H₂SO₄ genutzt. In ein Gefäß PbO₂ (Pulver) wurde konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Hierüber wurde Butanol überschichtet. In dem

10 Butanol war der Ru²⁺-Komplex in einer Konzentration von 1 mmol gelöst. An der Grenzfläche zwischen H₂SO₄ und Butanol findet die Oxidation des Ru²⁺-Komplexes statt. Nach erfolgter Oxidation des Ru²⁺-Komplexes zu Ru³⁺ wurde Lithium zugegeben. An der Grenzfläche zwischen H₂SO₄ und Butanol wird dabei naszierender Wasserstoff gebildet. An dieser Grenzfläche wurde

15 eine ausgeprägte Ruthenium-Chemilumineszenz beobachtet.

Auch bei elektrochemischer Oxidation von Ru³⁺ aus Ru²⁺ und anschließender Erzeugung von naszierendem Wasserstoff durch Li/Butanol/H₂SO₄ konnte Ru-Chemilumineszenz beobachtet werden.

20

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes als Markierungsgruppe, dadurch gekennzeichnet, dass eine Chemilumineszenz des Metallkomplexes angeregt wird durch die Schritte
- (i) Oxidieren des Metallkomplexes und
 - (ii) Reduzieren des Metallkomplexes durch naszierenden Wasserstoff, wobei eine chemilumineszenzfähige Form des Metallkomplexes entsteht und
 - (iii) Bestimmen des Analyten über die Chemilumineszenz.

15

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Metallkomplex als Markierungsgruppe verwendet, der eine Struktur der allgemeinen Formel (I) enthält:

20



worin

- M ein zwei- oder dreiwertiges Metallkation ausgewählt aus Seltenerde- oder Übergangsmetallkationen ist,
- L_1 , L_2 und L_3 gleich oder verschieden sind und Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei L_1 , L_2 und L_3 über Stickstoffatome an das Metallkation gebunden sind, Y einen an einen der Liganden gebundenen Linker bedeutet,
- m eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und
- n eine ganze Zahl von 1 bis 6 ist.

30

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Metallkomplex einen Rutheniumkomplex verwendet.
- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Liganden des Metallkomplexes ausgewählt werden aus
Bipyridin- oder Phenanthrolin-Ringsystemen.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Metallkomplex mindestens eine hydrophile Gruppe oder/und
einen Ladungsträger enthält.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Metallkomplex als Konjugat mit einem Nachweisreagenz für
den Analyten verwendet wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Nachweis als homogener Test durchgeführt wird.
- 25 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Nachweis als heterogener Test durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass die Oxidation des Metallkomplexes elektrochemisch erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Oxidation durch Anlegen eines anodischen Potentials von
mindestens +1,2 V (bezogen auf eine Ag/AgCl-Referenzelektrode)
erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Oxidation des Metallkomplexes chemisch erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Oxidation durch PbO₂, Permanganat, Cer⁴⁺-Verbindungen
oder/und Peroxodisulfat erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Reduktion räumlich oder/und zeitlich getrennt von der
Oxidation erfolgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass der naszierende Wasserstoff in unmittelbarer Nachbarschaft
des Metallkomplexes erzeugt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der naszierende Wasserstoff elektrochemisch erzeugt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die elektrochemische Erzeugung durch Anlegen einer Spannung
von $\leq -1,0$ V bezogen auf eine Ag/AgCl-Referenzelektrode erfolgt.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der naszierende Wasserstoff chemisch erzeugt wird.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die chemische Erzeugung durch Li/Butanol/ H_2SO_4 , Zn-
Cu/Ethanol oder Zn/HCl erfolgt.
- 15 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der naszierende Wasserstoff mittels Ultraschall erzeugt wird.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Erzeugung mittels Ultraschall durch Abstraktion von
Wasserstoff-Radikalen aus organischen Verbindungen, insbesondere
Alkylverbindungen, erfolgt.
- 25 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
umfassend eine chemische Oxidation des Metallkomplexes und eine
elektrochemische Erzeugung des naszierenden Wasserstoffs.
- 30 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass Oxidation und Erzeugung des naszierenden Wasserstoffes in
zwei getrennten Reaktionskammern erfolgt.

23. Vorrichtung zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes als Markierungsgruppe, umfassend:
- (i) Mittel zum Oxidieren des Metallkomplexes,
 - 5 (ii) Mittel zum Erzeugen von naszierendem Wasserstoff und
 - (iii) Mittel zum Nachweis von Chemilumineszenz.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
- 10 dass die Mittel (i) und (ii) zwei separate Reaktionskammern umfassen.
25. Vorrichtung nach Anspruch 23 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
- 15 dass Mittel (i) zur chemischen Oxidation des Metallkomplexes vorgesehen sind.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
- 20 dass Mittel (ii) zur elektrochemischen Erzeugung von naszierendem Wasserstoff vorgesehen sind.
27. Verfahren zur Erzeugung von Chemilumineszenz umfassend das Bereitstellen eines lumineszierenden Metallkomplexes, das Oxidieren des Metallkomplexes und das Reduzieren des Metallkomplexes durch naszierenden Wasserstoff, wobei eine chemilumineszenzfähige Form des Metallkomplexes entsteht.
- 25
28. Vorrichtung zur Erzeugung von Chemilumineszenz umfassend:
- 30 (i) Mittel zum Oxidieren eines lumineszierenden Metallkomplexes und
 - (ii) Mittel zum Erzeugen von naszierendem Wasserstoff.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/09299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 432 722 B1 (PUNZMANN GABRIELE ET AL) 13 August 2002 (2002-08-13) the whole document	1-10, 14-16, 23,26-28
X	US 6 271 041 B1 (POWELL MICHAEL JOSEPH ET AL) 7 August 2001 (2001-08-07) column 9, line 48 -column 17, line 40; figure 1	1,3,4, 6-10, 14-16, 23,26-28
A	WO 02 00726 A (SCHIFFRIN DAVID JORGE ;WILSON ROBERT (GB); LUMIGEN INC (US); AKHAV) 3 January 2002 (2002-01-03) figures 1,2,7	1-22
X		23-28
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 09299

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG MINLI ET AL: "Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 461, no. 1, 12 June 2002 (2002-06-12), pages 141-146, XP002262847 ISSN: 0003-2670	1-22
X	abstract	23-28
A	CA 2 313 144 A (WELK PAUL) 30 December 2001 (2001-12-30) abstract	22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP/09299

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6432722	B1	13-08-2002	DE 19811582 A1	23-09-1999
			EP 0949503 A1	13-10-1999
			JP 11311607 A	09-11-1999
			US 2001036673 A1	01-11-2001
US 6271041	B1	07-08-2001	US 6165729 A	26-12-2000
			US 5147806 A	15-09-1992
			US 5846485 A	08-12-1998
			AT 161096 T	15-12-1997
			AU 641374 B2	23-09-1993
			AU 4657289 A	28-05-1990
			AU 667594 B2	28-03-1996
			AU 5269793 A	10-03-1994
			CA 2002099 A1	03-05-1990
			DE 68928492 D1	22-01-1998
			DE 68928492 T2	20-08-1998
			EP 0441894 A1	21-08-1991
			HK 1006353 A1	19-02-1999
			JP 4502964 T	28-05-1992
			JP 7006913 B	30-01-1995
			WO 9005296 A1	17-05-1990
			US 6451225 B1	17-09-2002
			DE 3751516 D1	19-10-1995
			DK 16293 A	12-02-1993
			DK 689787 A	25-02-1988
			EP 0265519 A1	04-05-1988
			FI 875732 A	28-12-1987
			JP 7037464 B	26-04-1995
			JP 1500146 T	19-01-1989
			KR 9616340 B1	09-12-1996
			NO 875476 A ,B,	23-02-1988
			NO 943690 A	23-02-1988
			US 5591581 A	07-01-1997
			AT 127923 T	15-09-1995
			AT 212030 T	15-02-2002
			AU 685071 B2	15-01-1998
			AU 5754094 A	12-05-1994
			AU 644150 B2	02-12-1993
			AU 7433891 A	08-08-1991
			AU 605158 B2	10-01-1991
			AU 7581687 A	24-11-1987
			CA 1339465 C	16-09-1997
			DE 3752345 D1	21-02-2002
			DE 3752345 T2	22-08-2002
			EP 0647849 A2	12-04-1995
			EP 0658564 A1	21-06-1995
			HK 1007442 A1	09-04-1999
			HK 1013653 A1	13-09-2002
			IL 101990 A	04-01-1998
			IL 110557 A	04-01-1998
			IL 119484 A	11-04-1999
			IL 119895 A	19-03-2001
WO 0200726	A	03-01-2002	AU 1561002 A	08-01-2002
			EP 1322670 A1	02-07-2003
			WO 0200726 A1	03-01-2002
CA 2313144	A	30-12-2001	CA 2313144 A1	30-12-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler .. Aktenzeichen

PCT 03/09299

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/533

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 432 722 B1 (PUNZMANN GABRIELE ET AL) 13. August 2002 (2002-08-13) das ganze Dokument	1-10, 14-16, 23,26-28
X	US 6 271 041 B1 (POWELL MICHAEL JOSEPH ET AL) 7. August 2001 (2001-08-07) Spalte 9, Zeile 48 -Spalte 17, Zeile 40; Abbildung 1	1,3,4, 6-10, 14-16, 23,26-28
A	WO 02 00726 A (SCHIFFRIN DAVID JORGE ;WILSON ROBERT (GB); LUMIGEN INC (US); AKHAV) 3. Januar 2002 (2002-01-03)	1-22
X	Abbildungen 1,2,7	23-28
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Diez Schlereth, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YANG MINLI ET AL: "Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters" ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 461, Nr. 1, 12. Juni 2002 (2002-06-12), Seiten 141-146, XP002262847 ISSN: 0003-2670	1-22
X	Zusammenfassung ---	23-28
A	CA 2 313 144 A (WELK PAUL) 30. Dezember 2001 (2001-12-30) Zusammenfassung -----	22

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 09299

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6432722	B1	13-08-2002	DE 19811582 A1 23-09-1999
			EP 0949503 A1 13-10-1999
			JP 11311607 A 09-11-1999
			US 2001036673 A1 01-11-2001
US 6271041	B1	07-08-2001	US 6165729 A 26-12-2000
			US 5147806 A 15-09-1992
			US 5846485 A 08-12-1998
			AT 161096 T 15-12-1997
			AU 641374 B2 23-09-1993
			AU 4657289 A 28-05-1990
			AU 667594 B2 28-03-1996
			AU 5269793 A 10-03-1994
			CA 2002099 A1 03-05-1990
			DE 68928492 D1 22-01-1998
			DE 68928492 T2 20-08-1998
			EP 0441894 A1 21-08-1991
			HK 1006353 A1 19-02-1999
			JP 4502964 T 28-05-1992
			JP 7006913 B 30-01-1995
			WO 9005296 A1 17-05-1990
			US 6451225 B1 17-09-2002
			DE 3751516 D1 19-10-1995
			DK 16293 A 12-02-1993
			DK 689787 A 25-02-1988
			EP 0265519 A1 04-05-1988
			FI 875732 A 28-12-1987
			JP 7037464 B 26-04-1995
			JP 1500146 T 19-01-1989
			KR 9616340 B1 09-12-1996
			NO 875476 A ,B, 23-02-1988
			NO 943690 A 23-02-1988
			US 5591581 A 07-01-1997
			AT 127923 T 15-09-1995
			AT 212030 T 15-02-2002
			AU 685071 B2 15-01-1998
			AU 5754094 A 12-05-1994
			AU 644150 B2 02-12-1993
			AU 7433891 A 08-08-1991
			AU 605158 B2 10-01-1991
			AU 7581687 A 24-11-1987
			CA 1339465 C 16-09-1997
			DE 3752345 D1 21-02-2002
			DE 3752345 T2 22-08-2002
			EP 0647849 A2 12-04-1995
			EP 0658564 A1 21-06-1995
			HK 1007442 A1 09-04-1999
			HK 1013653 A1 13-09-2002
			IL 101990 A 04-01-1998
			IL 110557 A 04-01-1998
			IL 119484 A 11-04-1999
			IL 119895 A 19-03-2001
WO 0200726	A	03-01-2002	AU 1561002 A 08-01-2002
			EP 1322670 A1 02-07-2003
			WO 0200726 A1 03-01-2002
CA 2313144	A	30-12-2001	CA 2313144 A1 30-12-2001